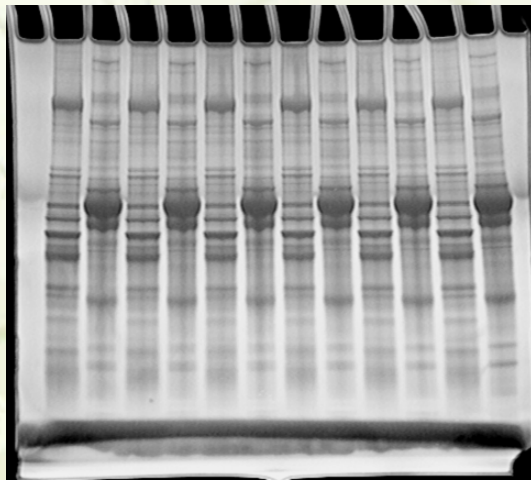
電気泳動の後

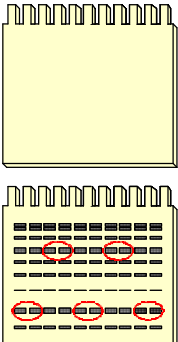
リバース染色とアトプレップMF（遠心濾過）によるタンパク質回収

タンパク質をSDS－PAGE後、
リバース染色

電気泳動し高感度に染色、バンド切出し後、遠心濾過
と組合せて高効率でタンパク質を回収します。

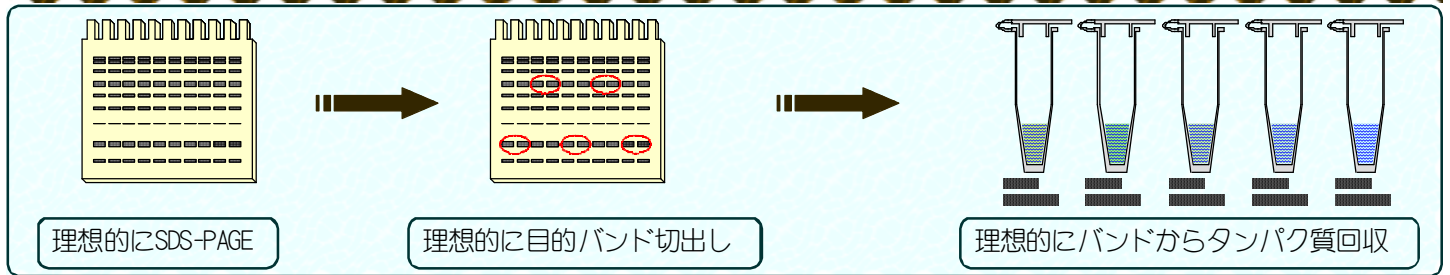
リバース染色試薬 *EzStainReverse*

遠心ろ過材 *アトプレップMF*

ATTO Corporation
3-2-2 Motoasakusa Taito-ku Tokyo 〒111-0041
TEL 03-5827-4861 FAX 03-5827-6647
URL http://www.atto.co.jp

ATTO Corporation (Osaka)
2-8-1 Higashi-Tenman Kita-ku Osaka City
〒530-0044
TEL 06-6136-1421 FAX 06-6356-3625

SDS-PAGE 後、バンドからタンパク質回収

タンパクの質電気泳動、バンド切出し、タンパク質回収の理想

理想的にSDS-PAGE　　理想的に目的バンド切出し　　理想的にバンドからタンパク質回収

タンパク質の電気泳動、バンド切出し、タンパク質回収の現実

質問		回答
Q1. 電気泳動の後、バンドからタンパク質を回収したいが?		A1. SDS-PAGE直後に目的バンドを切出せば、タンパク質をそれ以上変性させずに、回収できます。しかし、電気泳動後のゲルは無色透明なので、バンドを識別できません。 染色などすればバンド箇所を識別できますが、CBB(クマシーブリリアント ブルー)染色や銀染色するとタンパク質とゲルは強固に結合しバンド切出し後、タンパク質溶出を困難にします。
Q2. タンパク質に影響を及ぼさない染色方法はないか?	リバース染色	A2. タンパク質への影響が少ないリバース染色方法があります。ゲル背景を染めバンドは染めません。ゲル切出し後、容易に染色剤を洗い落とせ、切出したゲルを染色前の状態に戻す事が可能です。
Q3. 切出したゲルから効率よくタンパク質を回収できるのか?	ゲルをすり潰して タンパクを溶出	A3. スラリー化・タンパク質溶出・遠心濾過を組合せた方法を推奨します。リバース染色(*EzStain Reverse*)+遠心濾過用品(アトプレップMF)を用います。
Q4. A3.の方法の利点は何か?	変性の可能性が低い	A4. タンパク質への影響はゲルをすり潰す力(スラリー化)と遠心(濾過)する力(14,000G)のみです。濾過したタンパク質溶液は組成・イオン強度・pHともに電気泳動後と同一です。
Q5. 回収液にはタンパク質の他、電気泳動に関与した成分も含まれているのではないか?	更に必要に応じ、 脱塩・濃縮・分別が 可能	A5. 濾過液には電気泳動終了までに至る各成分が含まれています。限外濾過膜を備えた分別用品(アトプレップUF)を用いて、膜上にタンパク質を残し、緩衝液成分など低分子量成分を通過させます。脱塩、濃縮、或は必要に応じタンパク質成分を2分します。
Q6. どのような器具や試薬を使うのか? また、操作方法は?	キット、操作手順書	A6. 一連の工程に応じたキットと操作手順書を取揃えています。 AE-1310型*EzStain Reverse*　：リバース染色試薬キット AB-1171型アトプレップMF　：ゲルからのタンパク質回収 パジェル、e・パジェル　　：ポリアクリルアミド既製ゲル

リバース染色とタンパク質回収との関係

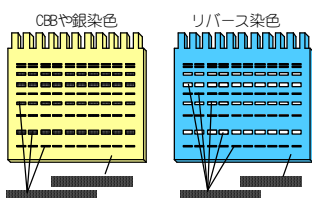
実験コストダウンをATTO高性能・高品質試薬で!

リバース染色の特長

①可逆的染色	リバース染色は、染色後、染色剤を容易に除去でき、タンパク質にも穏和です。
②操作	主として「染色液」と「発色液」の2種類を用い、全7ステップです
③短時間で発色	約25分間で発色します。全染色操作終了まで約30分間と短時間です。
④発色停止	発色液を精製水と交換するだけで、発色は停止します。
⑤高感度	タンパク質として10ng/バンド
⑥排液処理	廃液用容器に『染色液』と『発色液』を排液すれば、亜鉛イオンは沈殿処理されます。
⑦用途	タンパク質回収の為のゲル染色。 リバース染色→タンパク質回収→各種用途(抗体、質量分析など)

リバース染色の紹介

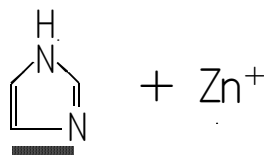
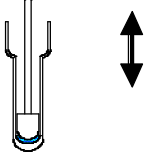
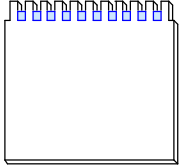
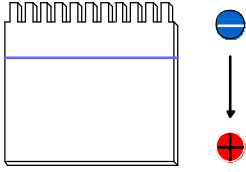
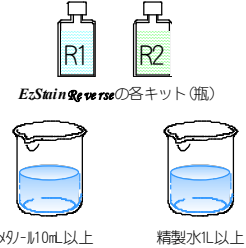
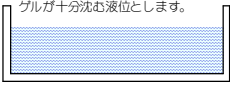
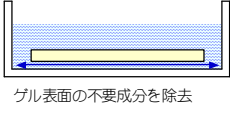
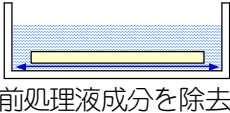
Q7. CBB染色や銀染色はタンパク質回収に不適当なのか?

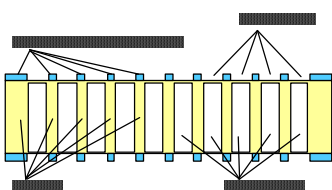
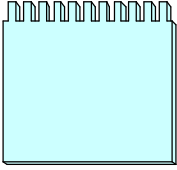
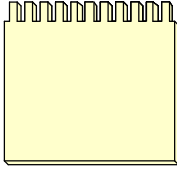
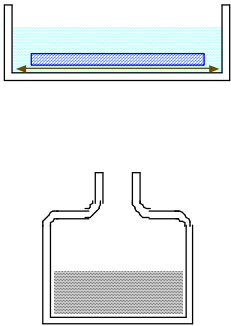
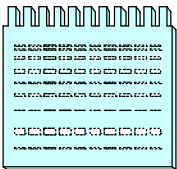
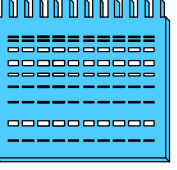
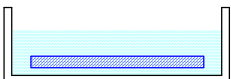
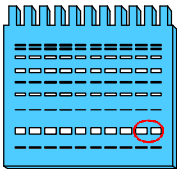
Q8. リバース染色はCBB染色や銀染色と何処が違うのか?何故リバース染色というのか?

A7. CBB染色や銀染色では色素や銀イオンがタンパク質と結合し、又ゲルとも結合します。その為、バンド切出し後タンパク質回収を困難にします。

A8. リバース染色では染色剤はゲル表面にのみ付着し、ゲル内部には浸透しません。また、タンパク質バンドに染色剤は付着しないので、背景表面は白濁色に染色されバンドはほぼ無色透明となります。
バンドと背景の染色箇所が逆なので、リバース染色と言います。

Q9. タンパク質回収に有用という事だが?

A9. ゲル表面に付着したリバース染色剤を容易に洗い落とせるので、可逆的染色法と言えます。リバース染色後、目的バンドを切出し、付着している染色剤を洗い落とせば、電気泳動直後の状態に戻せます。
この状態ならば、容易にゲルからタンパク質を回収できます。

Q10. リバース染色剤の本体は何か?

A10. 重金属イオンと弱塩基の組合せです。アトー㈱リバース染色剤キットAE-1310型***EzStain Reverse***は最良の組合せとされる亜鉛イオンとイミダゾールを組合せています。

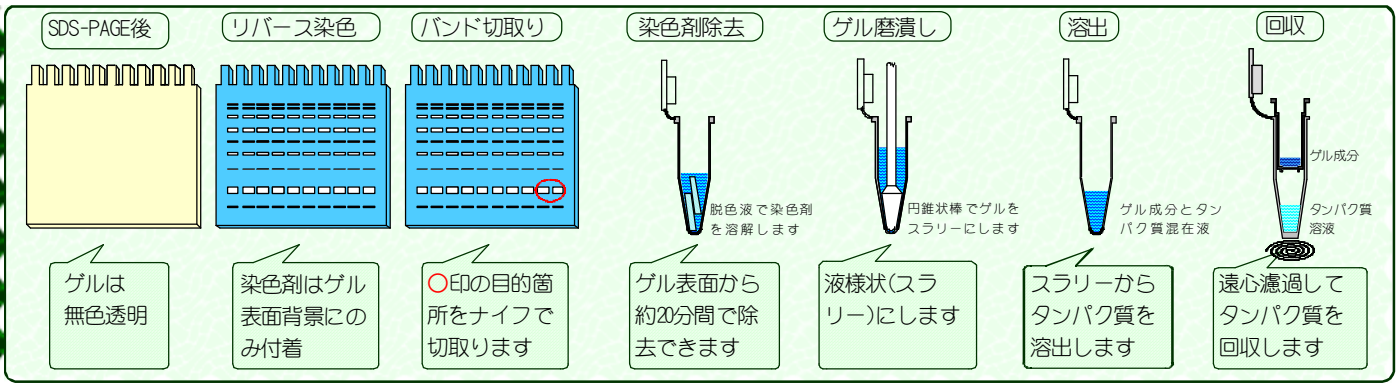
Q11. リバース染色の原理は何か?

A11. イミダゾール・亜鉛複合体は不溶性の為、ゲル表面に付着しますが、全体に比しSDSはバンド箇所(タンパク質)に高濃度に結合しているので、イミダゾール・亜鉛複合体の溶解度は増し、沈着しないとされています。それ故、白濁背景に無色透明バンドの電気泳動像となります。

リバース染色試薬キット AE-1310型

工程名	図解	使用方法の要点
1. SDS-PAGE電気泳動 ①タンパク質試料調製		1. SDS-PAGE(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動) ①試料調製はSDS-PAGEで良好な電気泳動像を得る為に重要な工程です。 試料調製にはアトーサンプル調製用バッファーAE-1430型*EzApply*をおすすめします。
②タンパク質試料添加		②試料添加量 幅4.5mmのウェル(アトーパジェル12検体用など)ならば、総タンパク質量で1～5μg程度の範囲内とします。
③SDS-PAGE・通電		③適切にSDS-PAGEします。 一例としてミニゲル(90×80×1mm程度)とします。
2. リバース染色	反応温度	2. 反応温度 環境温度25℃±3程度で操作します。実験室の温度は一般に、この範囲内と想定しています。
3. 容器と試薬を準備し、溶液調製	R1 R2 *EzStain Reverse*の各キット(瓶) メタノール10mL以上　精製水1L以上	3. 試薬準備、溶液調製 ①*EzStain Reverse*一式 ②ゲルよりも一回り大きいプラスチック容器(タッパーなど透明ないし白色の蓋付容器が良好) ③特級メタノール10mL以上(固定液調製用) ④精製水(蒸留水以上)1L以上
4. 一般的注意点 工程時間・手袋	実験用手袋着用厳守	4. 注意事項 必ず手袋を着用し、取扱説明書通りに実験して下さい。 *EzStain Reverse*は最短時間・最小作業で最良のリバース染色像を得るように作製されていますので、工程時間はできるだけ正確に守って下さい。
5. リバース染色操作 ①SDS-PAGE終了前に、『前処理液』を準備	ゲルが十分沈む液位とします。	5. リバース染色操作 ①『前処理液』でゲル表面上の(リバース染色に)不要な成分を除去します。ミニゲルより一回り大きい程度の容器なら、100mL注入すればゲルが十分沈む液位(深さ)となります。
②SDS-PAGE後のゲルを『前処理液』に入れ、5分間振とうし排液します。	ゲル表面の不要成分を除去	②振とう強度(速度)はゲルがトレイの底に付着せず緩慢に滑り動いている程度が最適です。強過ぎるとゲルを損ないます。シーソー式や水平往復式の振とう器を推奨します。
③『精製水』で30秒間振とうし排液します。	前処理液成分を除去	③主としてゲル表面のメタノールを除去する工程です。できるだけ30秒間を守って下さい。

EzStain Reverse 使用方法の要点

操作		説明
④『染色液』を60mL注入し、10～20分間振とうした後、沈澱用廃液容器に排液します。		④振とうしつつ、『染色液（イミダゾール＋SDS）』でゲル表面を覆います。振とう時間はゲル濃度に応じて増減します。5%ゲルならば10分間、20%ゲルならば20分間、5～20%の範囲のゲルならば15分間とします。『染色液』は沈澱用廃液容器に排液します。
⑤『精製水』を100mL注入して約30秒間振とうし、排液します。		⑤『精製水』でゲル表面の過剰な『染色液』を除去する工程です。できるだけ30秒間を守って下さい。
⑥『発色液』を60mL注入して、発色させ、沈澱用廃液容器に排液します。	『染色液』+『発色液』=白色沈殿 亜鉛イオンを 沈殿物とします。	⑥『発色液（硫酸亜鉛主成分）』と反応し、ゲル全体に難溶性のイミダゾール・亜鉛複合体が沈着します。沈着物は白色なので、黒色の紙などの上に容器を置いて観察し易くします。 1～3分間で発色します。適度な発色の一歩手前で『発色液』を沈澱用廃液容器に排液し、下記⑦のように『精製水』を注入して発色停止します。（できるだけ手早く液交換します） **注意：** 工程中、沈殿用廃液容器に『染色液』と『発色液』を順次廃液すると、亜鉛イオンは白色沈殿します。両溶液を等量混合する必要がある為、その都度空の容器を用いるよう推奨します。 沈殿物を濾過した後、廃棄処理します。
⑦発色停止の為に、『精製水』を100mL注入、2分間振とうし、排液します。		⑦適度な発色の一歩手前で『発色液』を排液し、直ちに『精製水』を注入し、発色を停止させます。上述⑥から本項⑦まで迅速に操作しないと、その間発色は進みます。
⑧確実に発色停止します。『精製水』を再度100mL注入、5分間振とうし、排液します。		⑧この工程で、発色は確実に停止します。
(⑨染色像を記録するか、少量の水と共に保存します。)		(⑨リバース染色の場合、乾燥すると染色像は消滅します。画像を取り込むか、少量の水を入れた容器・袋に入れて保存します。この際、一週間迄は良好に染色像を保持します。)
⑩これでリバース染色作業は終了です。必要に応じ、目的箇所のバンドを切出し、タンパク質を回収します。	○印箇所は目的バンド	⑩バンドを切出し、タンパク質を回収する作業に進みます。(次のページへ進みます)。

リバース染色後 → バンド切出し

遠心濾過用品AB-1170型アトプレップMFによる回収例（スラリー→タンパク質溶出→遠心濾過）

手順	図	説明
①目的バンドの切出し。		①ゲルを黒紙などの上に置き、ナイフなどでバンドを切り出します。切出すゲル体積は1.5mL遠心管1本当たり100μL以下とします。1mm厚のゲルならば6×16mm: 96μLとなります。
②ゲル片を1.5mL遠心管に入れます。	1.5mL遠心管 / ゲル切断片	②ピンセットなどで底の方に入れます。
③Laemmli泳動用緩衝液を500μL注入、10分間緩慢に振とうし、排液します。 ④上述③を繰り返します。	二回目	③穏和にリバース染色剤は溶解・除去されます。溶解・除去に使用した溶液は、Laemmli泳動用緩衝液ですので、タンパク質にとっても穏和です。 ④リバース染色剤を更に除去します。
⑤新たにLaemmli泳動用緩衝液を100μL 注入します。		⑤ゲル＋液の状態にします。この液を入れないと以下⑥でゲルはボロボロの状態になります。
⑥円錐状の棒を上下しゲルを液様化(スラリー化)します。		⑥1.5mL遠心管と円錐棒を密着しゲルをすり潰します。ゲルは粒状ではなく、液様状(スラリー)となります。
⑦円錐棒をLaemmli用緩衝液100μLで洗い落します。		⑦タンパク質の損失を少しでも節約します。
⑧緩慢に1時間振とうします。	スラリー	⑧振とう器を用いて下さい。この工程でスラリーから自然にタンパク質は溶出されます。
⑨スラリーを(遠心濾過用品)AB-1171型アトプレップMFに移します。	φ0.2μm濾過膜 / AB-1171型アトプレップMF	⑨スラリーをマイクロピペットなどで移します。アトプレップMFの内筒(サンプルカップ)の底には孔径φ0.2μmの濾過膜が設置されています。
⑩Laemmli泳動用緩衝液50μLを用いてスラリーの残りを洗い、アトプレップMFに移します。	ｽﾗﾘｰが入っていた1.5mL遠心管 / 洗った液を右図のAB-1171型ｱﾄﾌﾟﾚｯﾌﾟMFに移します。	⑩タンパク質の損失を少しでも節約します。
⑪14,000Gにて10分間遠心濾過します。	ポリアクリルアミドゲル成分 / (濾過液)タンパク質成分	⑪濾過膜上にポリアクリルアミドゲル成分が残り、タンパク質は濾過液となります。

既製ゲル「e-PAGEL　e・パジェル」のご紹介

製品の仕様

型式・名称	E-T7.5/10/12.5/15/1020/520L E-T15S　e・パジェル®	E-R7.5/10/12.5/15/1020/520L E-R15S　e・パジェル®	E-D7.5/10/12.5/520L e・パジェル®
泳動プレート	サイズ：120mm(W)×100mm(H)　材質：ガラス		
ゲルサイズ	90mm(W)×83mm(H)　厚さ1mm		
ゲル組成	主に ポリアクリルアミド、トリス−HClバッファー		
ゲル濃度 分画分子量範囲	（下表参照）		
サンプルコウム (標準検体数)	14検体(幅4.2mm) 最大アプライ量 約24μL/ウエル	18検体(幅2.9mm) 最大アプライ量 約15μL/ウエル	なし(ウエルなし) 最長75mm1次元目ゲルに対応
包装単位	10枚／箱		
保存期間	冷蔵6ヶ月		

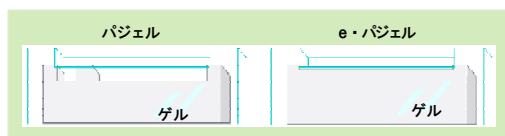
ゲル濃度・分画分子量範囲

型式	ゲル濃度	分画分子量範囲	
		タンパク質(Da)	DNA(bp)
E-T/R/D7.5L	7.5%	35,000～400,000	200～2500
E-T/R/D10L	10%	25,000～300,000	100～2200
E-T/R/D12.5L	12.5%	14,000～250,000	70～2000
E-T/R15L	15%	6,000～200,000	50～1500
E-T/R/D520L	5～20%	10,000～400,000	30～2500
E-T/R1020L	10～20%	6,000～300,000	30～2000
E-T/R15S	15%	1,000～100,000	―

(Da)　1000　1万　10万　50万

※ ゲル中にはSDSを含んでいません。タンパク質を泳動する際、SDSを添加した泳動用緩衝液(25mMトリス＋192mMグリシン＋0.1%SDS)で泳動すれば「Laemmli法」となり、SDSを添加しなければ「Ornstein-Davis法」となります。

※ DNAの泳動は、泳動用緩衝液25mMトリス＋192mMグリシン で実施します。

※ 2次元目用は、1次元目のゲルを添加 し易いフラットゲルです。(溝・ウエルはありません)

2次元目用「e・パジェル、c・パジェル」は「パジェル」とゲル上端形状が異なります。「e・パジェル、c・パジェル」は溝がありませんのでご注意ください。

関連製品　使用泳動装置

e・パジェルは下記泳動装置をご使用ください。泳動装置については別途カタログをご参照ください。

WSE-1100型パジェランーR　AE-6530P型ラピダス・ミニスラブ　AE-6500型ラピダス・ミニスラブ　AE-6510型レゾルマックス・二連ミニスラブ

注意：WSE-1100M型パジェランーR、AE-6531M型パジェラン、AE-6530M型ラピダス・ミニスラブ、AE-6510型レゾルマックス・二連ミニスラブでe・パジェルを使用　する場合にはパジェル用ホルダー(P/Hホルダー)が別途必要です。

コードNo.	名称	数量	価格
2393731	AE-6530P/H プレートホルダー(PAGEL用)2個組	1組	¥7,000
2331140	パジェル厚調整用2mmプレート	1枚	¥600

リバース染色キットAE-1310型 *EzStain Reverse*

	AE-1310型 *EzStain Reverse* (2332350)
①形式・名称	AE-1310型 *EzStain Reverse* (2332350)
②染色剤除去容易	染色は一時的、バンドを切出したら、染色剤除去
③タンパク質回収	切出し後、染色前に戻し、タンパク質回収
④質量分析に気配り	次いで、質量分析へ
⑤全操作時間	発色までに25分間＋α＝約30分間
⑥感度	CCB染色法 < リバース染色 < 銀染色
⑦荷姿	染色液(R-1)500mL＋発色液(R-2)500mL
⑧価格	¥16,000/ミニゲル50枚分

遠心濾過用品 アトプレップMF

商品コード	型式	商品名	濾過膜	適用容量	価格/1箱(50個)
3521370	AB-1171	アトプレップMF	0.2μm	500μL	¥20,000

粒子や不溶性物質の除去に。短時間(～30分)の遠心(～15000×g)でろ過終了。
吸着が少なく、ね詰まりしにくく、広範囲のpHに使用可能なPES膜を採用。

実験コストダウンをATTO高性能・高品質試薬で！

分子量マーカー　イージースタンダード

型式名称	AE-1440型 ***EzStandard***
キット形状	調製済タンパク質溶液、即使用可能
キット内容	6種類(97,200、66,400、45,000、29,000、20,100、14,300 Da)
使用量	3μL/幅4.5mmウェル：CBB染色用
内容量	500μL：約160ウェル分
有効期間	-20℃で約1年間
価格	¥9,800(1本)、¥19,000

製品の特長

- 各1万円を切って登場！
- 各バンドがシャープ
- 保存安定性にに自信あり
- 調製済みなので注入添加するだけ

サンプル調製用バッファー　イージーアプライ

型式名称	AE-1430型 ***EzApply***
調整後成分	ﾄﾘｽ-塩酸緩衝液、2%SDS、20%ｽｸﾛｰｽ、BPB 100mM DTT(ｼﾞﾁｵﾄﾚｲﾄｰﾙ)
キット形状使	DTT詰容器5本＋EzApply溶液詰容器1本
用方法	(DTT+EzApply溶液)：試料＝1：1に混合
有効期限	(DTT開封前)-20℃で6箇月、(DTT混合後)-20℃で1週間
価格	¥6,800

製品の特長

- 本品と試料を混合するだけで、試料調製完了
- 還元剤にDTT(ｼﾞﾁｵﾄﾚｲﾄｰﾙ)を採用
- 2-ME(2-ﾒﾙｶﾌﾟﾄｴﾀﾉｰﾙ)より還元反応は確実
- 2-MEによるよりも擬似ﾊﾞﾝﾄﾞの出現は少ない
- 2-MEより臭気は少ない
- お手頃価格

泳動バッファー　イージーラン

型式名称	AE-1410型 ***EzRun***
キット形態適	粉末混合物/袋
用量	10L分
使用方法	内容物を精製水1Lで溶解(10倍濃度溶液)
終濃度	25mMトリス＋192mMグリシン＋0.1%SDS
有効期間	粉末状態で室温2年、溶解して室温6個月
価格	¥4,800

製品の特長

- SDS-PAGEに対応
- 1袋で十分量
- 調製簡単、精製水に溶解するだけ
- お好みの容量・濃度に調製可能
- 粉末なので場所をとらず、長期保存OK
- お手頃価格

銀染色キット　イージーステインシルバー

型式名称	AE-1360型 ***EzStain Silver***
キット形状	S-1、S-2、S-3、S-4各液50mL詰
主成分	S-1液(ﾁｵ硫酸ﾅﾄﾘｳﾑ)、S-2液(硝酸銀)、S-3液(硫酸ナトリウム)、S-4液(HCHO)
適用枚数	90×80×1mmゲルで50枚
保存	室温遮光保存
価格	¥16,000

製品の特長

- 各種PAGE法に対応。
- 感度：ﾀﾝﾊﾟｸ質数ng/ﾊﾞﾝﾄﾞ、核酸十pg/ﾊﾞﾝﾄﾞ
- 発色までに55分間
- 爆発性の銀アミドを生成せず安全

高分離泳動バッファー　イージーランC⁺

型式名称	AE-1415型 ***EzRunC+***
キット形態適	粉末混合物/袋　10袋
用量	5L分
使用方法	内容物/袋を精製水500mLに溶解
終濃度	25mMトリス＋192mMグリシン＋0.1%SDS＋SH保護剤
有効期間	粉末状態で冷蔵1年、用事調製
価格	¥12,000

製品の特長

- SDS-PAGEに対応
- 泳動中のタンパク質の酸化(-SH基の再結合)を防ぎ、より正確な結果、シャープなバンドを目指す
- 調製簡単、精製水に溶解するだけ
- 粉末なので場所をとらず保存OK

CBB染色キット　イージーステインアクア

型式名称	AE-1340型 ***EzStain AQua***
キット形状	溶液 1L/本
主成分	クマシーブリリアントブルー、酸、安定化剤
適用枚数	90×80×1mmゲルで約25枚
保存	室温遮光保存
価格	¥9,800

製品の特長

- 調整済溶液　ready to use
- 有機溶媒(アルコール等)、酢酸未使用
- 30～120分の短時間で検出
- 透明に近いバックグラウンド

2013/4

アトー株式会社
生化学・分子生物学・遺伝子工学研究機器　開発/生産/販売/サービス
■本　社　〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2　TEL 03-5827-4861　FAX 03-5827-6647
■大阪支店　〒530-0044 大阪市北区東天満2-8-1 若杉センタービル別館 5F　TEL 06-6136-1421　FAX 06-6365-3625
■URL http://www.atto.co.jp　■本社 e-mail：info@atto.co.jp